

## 自己免疫疾患患者の血液細胞に特異的な遺伝子群の包括的単離と機能解析

研究分担者 野島 博 大阪大学微生物病研究所 教授

### 研究要旨：

高用量ヒト免疫グロブリン静注療法（IVIG）は川崎病などの自己免疫疾患に対する有効な治療のひとつである。本研究では、その仕組みを理解する手段のひとつとして、自己免疫疾患とくに難治性血管炎患者の血液細胞で特異的に転写誘導（抑制）されている遺伝子群を包括的に単離し、それらを貼り付けた選抜アレイ（focused microarray）を作製して低侵襲な血液 RNA 診断法として開発してきた。そのために、血管炎症候群（高安病、MPA、CSS など）、全身性エリテマトーデス（SLE）、慢性関節リウマチ、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）などの患者血液細胞（白血球）において共通に転写誘導（抑制）される遺伝子群を単離した。これらのうち約 200 遺伝子を三菱レイヨン（株）のジェノパールに搭載することで「不明熱・膠原病診断チップ」を作製した。これを用いれば不明熱患者の血液を調べただけで何%の確率で感染症でも悪性腫瘍でもなく、膠原病や血管炎症候群であると診断し、その後の精密診断に回すという検査システムの構築が可能となる。性能テストをしたところ、測定繰り返し誤差は 1%以下、アレイ間の誤差は 3%以下という正確さで測定できた。12名の高安病患者について健常人との比較検査をした結果、診断マーカーとして有用な可能性のある、すべて高安病患者で過剰発現している遺伝子が複数同定できた。

### A. 研究目的

自己免疫疾患患者の血液細胞で転写誘導（抑制）されている遺伝子群を包括的に単離することにより、疾患発症に深く関わっている遺伝子を見出して解析する。さらに単離した遺伝子の転写レベルを個々の患者で調べることによって病態との関連付けを行うことも目的とする。また選抜アレイして実用化することで、確定診断の難しい血管炎において、それらの発現パターンを診断のマーカーとして用いる可能性も探る。

### B. 研究方法

独自に開発した段階的サブトラクション法（多段差引法）と DNA チップ解析（Agilent, Hu44K）を用いて、難治性血管炎を含む自己免疫疾患患者の末梢血液細胞で転写誘導（抑制）されている遺伝子群を単離・同定した。これらを三菱レイヨン（株）のジェノパールに搭載して「不明熱・膠原病診断チップ」の試作品を作製し、それを最適に運転できる実験条件を設定して運用する。

対象とした自己免疫疾患を以下に列挙する：慢性関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、顕微鏡的多発血管炎（MPA）、

高安動脈炎(TA)、ウエゲナー肉芽腫症(WG)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、アレルギー性肉芽腫血管炎(AGA)、悪性関節リウマチ(MRA)、側頭動脈炎(GCA)、パージャ一病(BD)、結節性多発動脈炎(PN)。

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。本研究計画では遺伝子の発現量を検索するだけで塩基配列の違いを比較する訳ではないので、いわゆるゲノム倫理面の問題はないと考えられ、実際にゲノム倫理委員会でもそのような判断がなされたが、念のため規則に準じた扱いをした。また、これとは別に阪大の「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

### C. 研究結果

まず、この性能比較のために別途作製した、「感染体チップ」の試作品について、短い時間内で測定する際の検出下限濃度を決定した。次いで測定誤差の詳細な検証を進めた。まず行ったのはジェノパールシステム(とくに測定機器)の持つ、避けられない自然発生的な誤差がどの程度であるかの検証である。そのために、ひとつのアレイに対して連続して4回測定し、測定結果にどの程度の誤差が生じるかを観察した。この時に並行して行った実験はアレイ間の誤差についての検証である。この目的のために、一度に4枚のアレイを使い、同時に調製した同じプローブセット(感染体40種類)をハイブリダイズさせた。それらについて、前述のように連続して4回測定し、測定結果にどの程度の誤差が生じるかを観察した。

こうして得た合計 16 回の測定データについて誤差解析を進めた結果、測定繰り返し誤差は1%以下、アレイ間の誤差は3%以下という驚異的な正確さで測定されることが判明した(図1)。

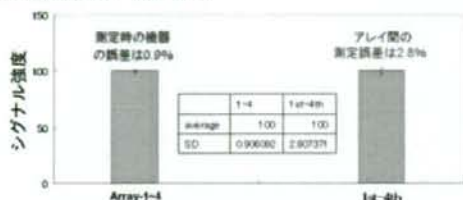


図1: 感染体チップ測定誤差検証の総まとめ。測定操作自体が本来持つ誤差(左)と、各アレイが本来有している誤差(右)を示す。

「不明熱・膠原病診断チップ」に対しても同様のテストを行って再現性を検証した。具体的には健常人や患者の血液細胞から抽出した mRNA を用いて作製したプローブを用いて不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングし、4回連続に測定した値の間の誤差が極めて低い事を証明できた。

次に今後の全ての診断データの基準となる健常人群におけるジェノパールの測定値を正確に求め対角ドット表示をした(図2)。

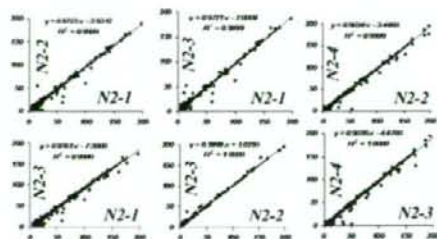


図2: 不明熱・膠原病診断チップ測定誤差の検証結果の対角ドット表示。対角線から離れる遺伝子ドットが少ない事とR<sup>2</sup>値が1.0に近い事は、再現性が良い(測定誤差が少ない)ことを意味する。

健常人の血液細胞から抽出した mRNA を用いて作製したプローブを用いて不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングし

た場合でも4回連続に測定した値の間の誤差はきわめて低い事を検証した。この結果は、不明熱・膠原病診断チップの品質が極めて優れている事を示す。

次に、12名の高安病血管炎の患者から採血サンプルから調製した mRNA をプローブとし、健康人由来の mRNA を比較プローブとして用いて不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングした。その結果、搭載した 216 個の遺伝子のうち 28 遺伝子について高安病血管炎の患者での発現亢進が検出できた(図3)。すなわち赤枠、青枠、紫枠で囲んだ 4, 4, 2 遺伝子について 12 人全員、11 人、10 人で、顕著に発現亢進していた。これらの遺伝子はいずれも我々が今回初めて同定した新規遺伝子である。今回の患者は全く新規な患者であることを考えると、この結果は不明熱・膠原病診断チップが診断に有用のみでなく、血管炎の遺伝子マーカーの発見にも役立つ事を示唆する。

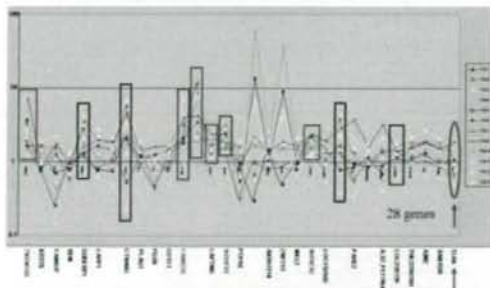


図3：12名の高安病血管炎の患者に対する不明熱・膠原病診断チップ検査の結果。赤枠で囲んだ遺伝子が発現亢進していればある不明熱患者が高い確率で高安病血管炎であると診断できるかもしれない。

一方、ジェノパールに搭載してある、多くの自己免疫疾患患者の血液細胞で共通に過剰発現していることを我々が見出した G0S2 遺伝子について詳細な機能解析を進

めた。G0S2 は細胞周期の静止 (G0) 期にある免疫細胞に増殖刺激を与えて複製(S)期に導入した際に転写誘導される遺伝子のひとつである。その機能を調べるためアクチンプロモーターを付けて過剰発現させたトランスジェニックマウス(G0S-TG)を作製して調べたところ、このマウスは生まれるものの病弱で、メスは妊娠しにくいだけでなく流産しやすかった。生き延びた大人マウスも組織内に微小膿疱(microabscess)に類似の病変が見られ、血清内には好核抗体や抗 DNA 抗体の値が上昇するなど、たとえば SLE などに見られる自己免疫疾患様の病態を示した(図4)。

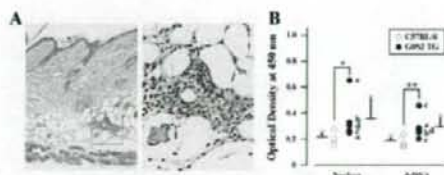


図4：G0S2-TG の示す異常。(A) G0S-TG の皮膚や皮下脂肪層に微小膿疱に類似の病変(枠内：右はその拡大図)が見られた。(B) G0S-TG の血清は健康マウス(C57BL/6)に比べて好核抗体や抗 DNA 抗体の値が上昇していた。

G0S2 の機能を調べるための道具として、G0S2 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製した。これらは、*in vitro* (TNT システムを使用) で生合成した Myc タグをつけた G0S2 タンパク質(6Myc-G0S2)を市販の Myc 抗体と同程度かそれ以上の感度で特異的に認識したのみでなく、2種類のモノクローナル抗体(#2-15, #3-1)は細胞あるいは組織の免疫染色においても有用である事を証明できた。この結果は、抗 G0S2 抗体が血液細胞抽出液をサンプルとした新たな免疫検出マーカーとして有用である可能性を示唆する。

#### D. 考察

不明熱 (FUO: fever of unknown origin) は「38・3℃以上の発熱が3週間以上続き、1週間検査しても診断のつかない発熱」と定義される原因不明の発熱症である (Petersdorf and Beeson, 1961)。約70%は精密な検査により感染症、非感染性炎症性疾患(膠原病や血管炎症候群)、悪性腫瘍のいずれかに原因が特定されるが、約30%は診断が未定に終わる。不明熱の診断を確かなものにするため、我々が今回作製した選抜アレイは末梢血液を資料とした不明熱を迅速・簡便に診断できる低侵襲な診断法として展開できる可能性を持つことを証明できた。

#### E. 結論

ここで開発した「不明熱・膠原病診断チップ」は今後の難治性血管炎の確定診断用ツールとして実用化できる可能性がある」と結論できる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kobayashi S, Ito A, Okuzaki D, Onda H, Yabuta N, Nagamori I, Suzuki K, Hashimoto H, Nojima H. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Res.*, 253-265, 2008.
- (2) Tougan T, Okuzaki D, Nojima H. Chum-RNA allows preparation of a

high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA without PCR amplification. *Nuc. Acids Res.*, 36(15):e92, 2008.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## CAWS 誘発マウス血管炎モデルにおける TNF- $\alpha$ 阻害薬

研究分担者 高橋 啓 所属 東邦大学 教授  
研究協力者 大原関利章、横内幸、山田仁美、佐地勉(東邦大学)

### 研究要旨：

これまでに我々は CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して免疫グロブリンを投与すると血管炎の発症が抑制されることを示した。今回は、近年川崎病などの血管炎疾患に対する新たな治療として試みられている TNF- $\alpha$  抗体製剤、TNF 受容体製剤に注目し、その効果を検討した。その結果、これら薬剤は本実験誘発血管炎を抑制し得た。

### A. 研究目的

CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して抗サイトカイン療法としての TNF- $\alpha$  阻害剤投与による血管炎抑制作用を検討する。

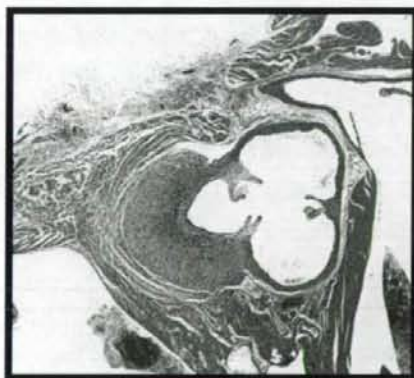
### B. 研究方法

C57BL/6N マウス(4 週齢、雄)に対し CAWS 4mg を連続 5 日間腹腔内接種した。ついで、インフリキシマブおよびエタネルセプトを複数回、腹腔あるいは皮下投与した。実験 5 週目に屠殺し、大動脈起始部および冠状動脈のステップ標本を作製し、血管炎の有無を病理組織学的に検討した。

### C. 研究結果

インフリキシマブ、エタネルセプト投与群共に、対照群と比較して血管炎発症頻度は抑制傾向を示した。血管炎の組織像は対照群との間で差異を見出せなかった。

両薬剤共に投与による心筋障害は観察されなかった。



### D. 考案

本実験系では CAWS 投与後血清 TNF- $\alpha$  が上昇することが示されており、TNF- $\alpha$  の作用を阻害することで血管炎の発症や炎症の進展を抑制できる可能性がある。今後、投与条件などを変更し、さらなる検討を行う予定である。

### E. 結論

本血管炎誘発モデルにおいて、TNF- $\alpha$  を阻害することで血管炎発症は抑制的に働く

ことが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 大原関利章、横内 幸、伊原文恵、若山 恵、高橋 啓：急性期川崎病血管炎の病理。東邦医学会誌 55:129-131, 2008
2. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, Garcia FL, Fox LM, Kos IM, Crawford SE, Russo PA, Hammad R, Takahashi K, Orenstein JM: RNA-containing cytoplasmic inclusion bodies in ciliated bronchial epithelium months to years after acute Kawasaki disease. PLoS ONE. 2008 Feb 13;3(2):e1582.
3. 大原関利章、横内 幸、高橋 啓：川崎病の最近の病因論、小児内科 41: 21-25, 2009
4. 高橋 啓、大原関利章、横内 幸：冠状動脈病変の病理、小児内科 41: 30-33: 2009
5. Kato H, Takahashi K: Kawasaki's disease. (GV Ball and SL Bridges ed.) Vasculitis, 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2008. p373-389

### 2. 学会発表

#### 国際会議

1. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Naoe S: Pathological characteristics of systemic vascular lesion of Kawasaki disease and other vasculitis syndrome,

Ninth International Kawasaki Disease Symposium, Taipei, 2008.4

2. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Yamada H, Naoe S, Saji T: Effect of anti-human TNF-alpha monoclonal antibody in mice vasculitis model caused by *Candida albicans* water soluble fraction. Ninth International Kawasaki Disease Symposium, Taipei, 2008.4
3. Oharaseki T, Yokouchi Y, Wakayama M, Ihara F, Yamada H, Naoe S, Takahashi K: Histopathology of late-stage arteritis in animal model of Kawasaki disease. Ninth International Kawasaki Disease Symposium, Taipei, 2008.4
4. Oharaseki T, Yokouchi Y, Wakayama M, Ihara F, Yamada H, Naoe S, Takahashi K: Correlation between post-arteritis lesions and atherosclerosis in animal model of Kawasaki disease. Ninth International Kawasaki Disease Symposium, Taipei, 2008.4
5. Takahashi K : Kawasaki disease. 27<sup>th</sup> International congress of the International academy of pathology. Athens, Greece, 2008.10
6. Takahashi K, Hotch M : Takayasu arteritis. 27<sup>th</sup> International congress of the International academy of pathology. Athens, Greece, 2008.10

#### 国内会議

1. ○高橋 啓、大原関利章、横内 幸、若山 恵、伊原文恵、直江史郎、提嶋真人、小泉ひろみ：急性期川崎病冠状動脈瘤破裂の1例。第97回日本病理学

会総会、金沢、2008.05

2. ○高橋 啓、大原関利章、横内 幸、直江史郎 系統的血管炎としての川崎病、第 14 回 MPO 研究会、東京、2008.10
3. ○大原関利章、横内 幸、若山 恵、伊原文恵、山田仁美、直江史郎、高橋啓：川崎病類似マウス動脈炎モデルにおける遠隔期血管病変の組織学的検討、第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008.05
4. ○大原関利章、横内 幸、若山 恵、伊原文恵、山田仁美、直江史郎、高橋啓：川崎病類似マウス動脈炎モデルにおける血管炎瘢痕と粥状硬化症の病理組織学的検討、第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008.05
5. ○大原関利章、横内 幸、若山 恵、伊原文恵、山田仁美、佐地勉、直江史郎、高橋 啓：川崎病動脈炎モデルにおける抗 TNF- $\alpha$  療法の血管炎抑制効果の検討、第 28 回日本川崎病研究会、札幌、2008.10

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 自己免疫性心筋炎の機序および融合蛋白治療の検討

研究分担者 相澤義房 新潟大学大学院医歯学総合研究 教授  
研究協力者 塙 晴雄 新潟大学大学院医歯学総合研究科 講師  
研究協力者 小玉 誠 新潟大学大学院医歯学総合研究科 准教授

研究要旨: 自己免疫性心筋炎(EAM)の発症には、サイトカイン/ケモカインが重要である。EAMにおけるこれらの役割を明らかにすることは、臨床における血管炎の機序の解明にもつながると考える。EAMの局所には、様々な細胞が存在し、これらの細胞が、様々なサイトカイン/ケモカインを産生し、お互い密接にクロストークしてEAMの発症、回復過程に関与している。EAMは、まず、病的T細胞と樹状細胞が接触し、T細胞がTh1サイトカインやIL-17を産生し、樹状細胞がIL-1やTNF- $\alpha$ を産生し、発症の引き金を引くと考えられている。今回我々は、T細胞、マクロファージ、樹状細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞の様々なサイトカイン/ケモカインの発現を検討し、それらのクロストークについて検討した。また、心筋炎組織中の心筋細胞の遺伝子発現をDNA microarrayで網羅的に検討し、どのような遺伝子発現が変化するかを検討した。さらに、ほとんどすべての炎症に重要であるIL-1を強力に抑制する作用を有するIg融合蛋白の作成を試みた。それらを検討した結果、炎症細胞だけでなく、線維芽細胞、平滑筋細胞が、多種類のサイトカイン/ケモカインを大量に産生し、EAMの発症に関与することが示唆され、また心筋細胞は、抗菌蛋白や鉄代謝に関わる蛋白など、いくつかの蛋白を急激に発現することが明らかになった。さらにIL-1受容体-IgホモダイマーやIL-1受容体アンタゴニストに比べ、IL-1受容体-Igヘテロダイマーが、桁違いに強いIL-1抑制作用を有することが明らかになった。

### A. 研究目的

実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の発症機序を明らかにする。特に心筋炎を構成する細胞によるサイトカイン/ケモカインのクロストークを明らかにする。それによって、ヒト血管炎のサイトカイン/ケモカインを介した発症機序の解明に役立つものと考えられる。また、心筋炎における心筋細胞の遺伝子発現をDNA microarrayを用いて網羅的に検討する。これによって、炎症により変化

する遺伝子発現を明らかにし、心筋炎、血管炎のバイオマーカーや治療薬の開発につながる可能性を探る。さらに、ほとんどの炎症性疾患の発症に大きく関わるIL-1に対する阻害薬の作成を検討する。

### B. 研究方法

EAMの心臓をランゲンドルフ還流下にコラゲナーゼ処理し、各細胞を分離した後、金属篩と抗CD11bc抗体、抗 $\alpha\beta$ TCR抗体、



マグネットビーズ抗体を用いて、心筋細胞、CD11bc<sup>+</sup>細胞、T細胞、非心筋非炎症細胞(NCNI)細胞を精製した。各細胞群が発現するサイトカイン/ケモカインおよびその受容体の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。また心筋炎の発症回復過程における時間的経過、心筋炎心臓から得られた培養細胞を用いたサイトカイン添加による変化も同様に検討した。心筋炎心筋細胞の遺伝子発現の網羅的検討については、SIGMA社製のDNA microarrayを用いて、7711種類の遺伝子発現を検討した。その中で、大きく変化している遺伝子については、定量的 RT-PCR にてさらに検討した。IL-1の阻害薬の検討では、哺乳細胞発現ベクター pCAGGS に IL-1 受容体タイプ II (IL-1RII)-Ig および IL-1 受容体アクセサリ蛋白 (IL-1RAcP)-Ig をそれぞれ組み込んだプラスミドを作成し、Fugen6 を用いて Cos7 細胞に遺伝子導入し、その培養上清を用いて検討した。IL-1 抑制作用の検討は、NRK49F 細胞に IL-1 $\alpha$  を添加し、同時に上記の培養上清を加えて、24 時間後に MCP-1 の発現を定量的 RT-PCR にて測定し、その阻害作用を検討した。

### C. 研究結果

EAM の心臓中の T 細胞は、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-17 が発現し、CD11bc<sup>+</sup>細胞からは、IL-1 $\alpha$  および  $\beta$ 、TNF- $\alpha$  が発現していた。しかし、NCNI 細胞にも、それらの受容体は明らかに発現が認められ、MCP-1、IL-6、G-CSF は、むしろほとんどが NCNI 細胞で発現が認められた。サイトカイン/ケモカインの時間経過を見ると、初期には IL-1、IL-17、IL-2、IL-6、MCP-1 の発現が認められ、一方 IL-10

は回復期に認められた。また、初期に上昇していたそれらは、炎症細胞浸潤があまり病理学的に認められない組織中で明らかに上昇していた。心筋炎の組織から得られた培養細胞に、IL-1 や IL-17 を添加すると、IL-6、MCP-1 の発現誘導が認められた。また異なる細胞が発現すると考えられる IL-1 と IL-6 や MCP-1 の組織中発現量の相関関係は、非常に良好であった (IL-1 vs IL-6,  $r=0.951$   $p<0.0001$ ; IL-1 vs MCP-1,  $r=0.944$   $p<0.0001$ )。以上より、心臓内の樹状細胞と病的 T 細胞の接触により産生されたサイトカインが、NCNI 細胞などに働き、IL-6、MCP-1、G-CSF などのサイトカイン/ケモカインを誘導し、炎症細胞の浸潤を誘導するのではないかと推測した。

心筋炎心臓の DNA microarray の解析では、PAP(pancreatitis associated protein)/Reg(regenerating gene)、 $\alpha 2 \mu$  globulin-related protein、Collagen XVIII、NCAM などが正常心筋細胞に比し、非常に発現が亢進していることが明らかになった。これらの一部は、抗菌蛋白あるいは鉄代謝に関連するものであり、最近注目されている蛋白であった。

IL-1 の阻害薬の検討では、IL-1RII-Ig のホモダイマー、IL-1RAcP-Ig のホモダイマーに比べ、それらのヘテロダイマーが桁違いに阻害作用を有していた。これは、現在臨床で使われつつある IL-1R アンタゴニスト (anakinra) に比し、約 10000 倍強力な効果であった。

### D. 考案

今までは、線維芽細胞、平滑筋細胞については、それほど積極的に炎症に関わって

いないのではないかと考えられていた。しかし、最近、筋線維芽細胞が、他の臓器でも様々なサイトカイン/ケモカイン/成長因子を産生し、またそれらの受容体を持つことが明らかになってきた。今後、血管炎の機序を考える上にも、重要な細胞として詳細に検討する必要があると考える。また DNA microarray によって網羅的な遺伝子発現の検討が可能になったため、今まで注目されなかった蛋白の重要性が、様々な分野で明らかになってきている。今回浮かび上がってきた抗菌蛋白や鉄関連蛋白は、再生、活性酸素種 (ROS)、アポトーシスなどに深く関わっていると想定される蛋白である。今後、その作用を明らかにする必要があり、バイオマーカーや治療薬の開発につながる可能性もある。IL-1 の阻害薬の検討では、驚くほど強力な IL-1 阻害作用が、IL-1R-Ig ヘテロダイマーでみられた。IL-1 は、他の炎症でも中心的な役割を果たすサイトカインである。この生物学的製剤は、今後血管炎でも有用になる可能性があると思われる。

#### E. 結論

1) EAM におけるサイトカイン/ケモカインのクロストークには、線維芽細胞、平滑筋細胞などが重要な役割を演じている可能性が示唆され、今後血管炎でも、それらの細胞に注目すべきではないかと考えられた。

2) EAM の心筋細胞は、抗菌蛋白や鉄代謝に関わる遺伝子の発現亢進がみられた。今後、バイオマーカーや治療薬などに使える可能性もあり、血管炎でも検討すべきと考えられた。

3) IL1-R ヘテロダイマーは強力な IL-1 抑制作用がみられ、今後血管炎などの治療に

使える可能性があるのではないかと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl Res.* 2008;152:119-27.

##### 2. 学会発表

・ Influence of heme on cultured cells from heart. 第 12 回日本心不全学会

・ Expression of hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction 第 72 回日本循環器学会総会

・ Iron related protein and influence of heme in rat myocarditis. The 25th Annual Meeting of ISHR Japanese Section

・ Crosstalk between component cells in rat autoimmune myocarditis with cytokine/chemokine The 25th Annual Meeting of ISHR Japanese Section

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

生物学的製剤

国際出願 (PCT/JP2008/051457)

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

## 食細胞 NADPH-オキシダーゼ欠損による肺炎の誘発

分担研究者： 荒谷康昭 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・教授

### 研究要旨：

酵母菌体膜成分であるザイモザンを食細胞 NADPH-オキシダーゼのノックアウトマウス（CGD マウス）の肺に投与すると、投与後 6 時間後にすでに肺胞気管支への好中球の浸潤が観察され、6 日目には野生型マウスよりも著しく重篤な好中球性の肺炎を呈した。さらに、この重篤な症状は少なくとも 1 ヶ月間持続した。すなわち、白血球からの活性酸素産生が欠如することによって、菌体抽出物刺激による好中球性の肺炎を発症しやすくなることが示された。

### A. 研究目的

活性化した好中球は、NADPH オキシダーゼを触媒として、酸素 ( $O_2$ ) からスーパーオキシド ( $\cdot O_2^-$ ) を産生する。 $\cdot O_2^-$  は、自発的あるいはスーパーオキシドジスムターゼの触媒により過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に代謝される。さらに  $H_2O_2$  は、ミエロペルオキシダーゼを触媒として塩化物イオン ( $Cl^-$ ) と反応し、次亜塩素酸 ( $HOCl$ ) に代謝される。本研究は、食細胞 NADPH オキシダーゼの欠損マウス (CGD マウス) を用い、好中球からの  $\cdot O_2^-$  産生が炎症疾患の発症にどのように関与しているのかを知ることを目的とした。

### B. 研究方法

実験には 8-10 週令の雌マウスを使用した。C57BL/6 マウス（野生型マウス）は

日本 SLC から購入した。CGD マウスは、インディアナ大学 Dr. M. Dinauer から分与を受けた。マウスは、横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて飼育管理した。

市販ザイモザンを PBS に懸濁し、各マウスに麻酔下で経鼻的に肺に投与した。投与後の肺症状の経時変化を解剖学および病理学的に観察するとともに、肺胞洗浄によって回収された炎症細胞数を計測した。さらに、その細胞種をフローサイトメトリーで同定した。

（倫理面への配慮）

実験動物は動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺す際には、頸椎脱臼法もしくはエーテル麻酔法で安楽死させた。

### C. 研究結果

野性型と CGD マウスにザイモザンを経鼻投与して肺炎を誘発させ、投与後 1、3、6、および 30 日目のマウスの肺組織切片を H&E 染色後、検鏡した。野性型マウスは、ザイモザン投与後 1 日目から 6 日目までごく軽度の肺炎が持続したに過ぎなかった。それに対して、CGD マウス肺の炎症の程度は、投与後 1 日目には、すでに野性型マウスよりも重篤になり、6 日目まで経時的に重篤化し (図 1)、少なくとも 30 日目まで沈静化は見られなかった。

次に、肺胞内に浸潤している細胞を肺胞洗浄で回収し、肺に集積している炎症細胞数を血球計算盤で計測した。ザイモザン非投与群の細胞数に有意な差は見られなかったが、CGD マウスでは、ザイモザン投与後 1 日目には、すでに野性型マウスの約 1.8 倍の細胞が集積した。さらに、ザイモザン投与後 6 日目では、CGD マウスは野性型マウスの約 5.6 倍の細胞が集積した (図 2A)。

次に、肺に集積した炎症細胞の細胞種を同定するために、回収した細胞をフローサイトメトリーで解析した。ザイモザン非投与群では、野性型と CGD マウス共に、肺胞中に存在している細胞のほとんどがマクロファージであった。野性型マウスのマクロファージ数は、ザイモザン投与後 6 日目までほぼ一定であったのに対して、CGD マウスでは有意に増加した。しかし、その増加量はごくわずかであっ

た (図 2B)。ザイモザンを投与することによって最も顕著に増加したのは好中球であった。ザイモザン投与後 6 時間目には、野性型マウスではほとんどがマクロファージであったのに対して、CGD マウスでは好中球が集積していた。CGD マウスの好中球数は、ザイモザン投与後 6 日目にかけて経時的に著しく増加し、その結果として、ザイモザン投与後 6 日目の CGD マウスの好中球数は、野性型マウスの約 7.5 倍となった (図 2C)。以上のことから、CGD マウスにザイモザンを経鼻投与すると好中球性の肺炎が誘発され、野性型マウスに比べ肺炎が重篤になることが明らかとなった。

### D. 考察

CGD マウスは、ザイモザン誘発性の好中球性肺炎が野性型マウスに比べて重篤となるという興味深い結果が得られた。つまり、好中球からの  $\cdot O_2^-$  産生の欠如は、炎症刺激による肺炎を助長することが明らかとなった。

生菌を NADPH オキシダーゼ欠損マウスの肺に感染させると、殺菌力が極度に低下しているために重篤な肺炎が生じてしまうことはすでに明らかにされている。このことから、 $\cdot O_2^-$  が生体防御に非常に重要であることがわかる。ところが、ザイモザンという酵母の抽出物を投与して肺炎を誘発させても、CGD マウスの方が肺炎が重篤となるということは、好中球からの  $\cdot O_2^-$  産生が欠如すると、生菌だけでな

く、菌体成分によっても炎症が重篤化することを意味する。

今後、この発症するメカニズムを追求して真の発症機構を知ることは、炎症疾患の発症機序の解明の一助になると考えられる。

## E. 結論

好中球からの $\cdot O_2^-$ 産生を欠如する好中球機能異常マウスは、ゼイモザンの肺投与によって重篤な肺炎を発症することが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 荒谷康昭 (分担): 好中球機能異常による呼吸器不全-ミエロペルオキシダーゼ欠損を中心に。医学のあゆみ (医歯薬出版) 224, 861-862 (2008)

2) 荒谷康昭 (分担): 真菌・細菌感染防御の鍵: 好中球 Myeloperoxidase<sub>o</sub> 細胞 (ニューサイエンス社) 41, 56-59 (2009)

### 2. 学会発表

1) 梅木 祐、瀬田玄樹、西川なつき、鈴木和男、荒谷康昭: Zymosan 誘発性肺炎における Myeloperoxidase の役割。第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月、東京

2) 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、中山俊憲、南谷晴之、鈴木和男: MPO-ANCA

による糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現。第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月、東京

3) Umeki, Y., Nishikawa, N., Suzuki, K., Aratani, Y.: Myeloperoxidase deficiency promotes zymosan- induced acute lung inflammation. 第 38 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月、京都

4) Nishikawa, N., Umeki, Y., Aratani, Y.: Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan- induced acute lung inflammation. 第 38 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月、京都

5) Nagao, T., Aratani, Y., Nakayama, T., Suzuki K.: Secretion of neutrophil chemotactic factors from glomerular endothelial cells by anti- myeloperoxidase antibody. 第 38 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月、京都

6) 荒谷康昭、梅木 祐、西川なつき、戸塚彩子、吉田后那、鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのゼイモザン誘発性肺炎の促進。日本農芸化学会 2008 年度大会、2009 年 3 月、福岡 (予定)

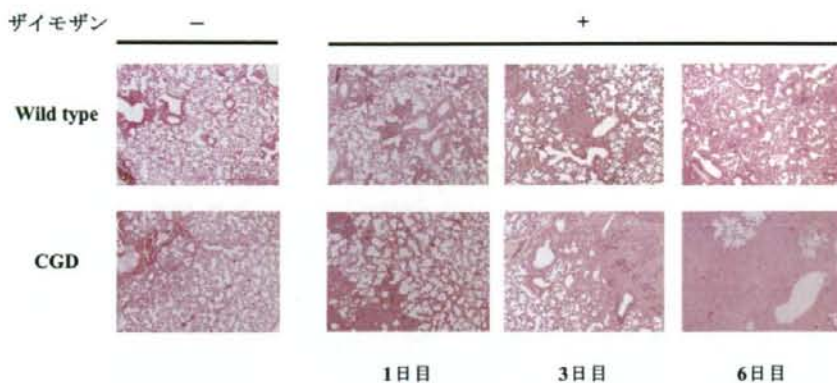


図1 ザイモザン投与後の野生型マウス（上段）とCGDマウス（下段）の肺のHE染色像

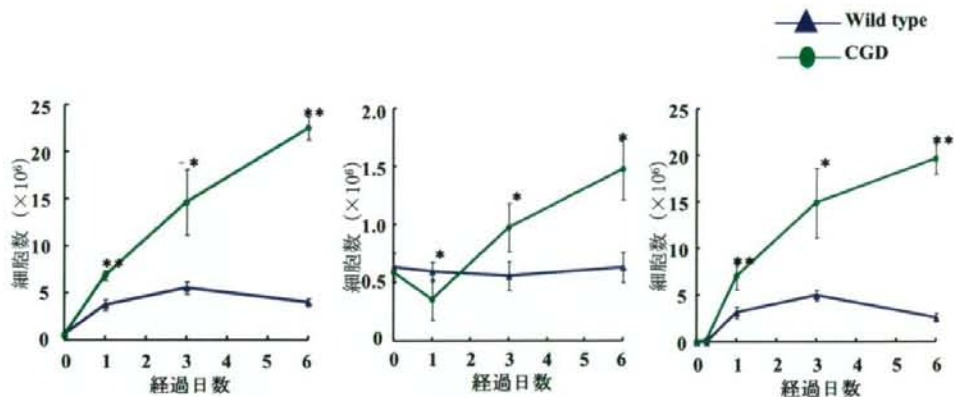


図2 肺胞洗浄液中のA) 全細胞数、B) マクロファージ数、C) 好中球数

\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.001$

## 顕微鏡的多発血管炎における血中サイトカイン・ケモカインの IgA 腎症との レベルの差異と、臨床・病理所見に関する特異性の検討

研究分担者 武曾恵理 財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科  
研究協力者 宇野賀津子 ルイ・バストール医学研究センター 基礎研究部室長  
古宮俊幸、猪原登志子 財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科  
城 謙輔 国立千葉東病院臨床研究センター免疫病理研究部  
鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 炎症制御学 教授

**研究要旨:**我が国の急速進行性糸球体腎炎(RPGN)の多くを占める、MPO-ANCA 陽性症例は全身性疾患としての顕微鏡的多発血管炎(MPA)に発症することが知られている。この疾患の初期には、各種炎症性サイトカインやケモカインが血中でストームとなって上昇することが知られているが、その臨床的意義に迫る試みを行っている。一方、この疾患の病理学的パラメーターを特定し、それらの所見が、生検時の臨床的パラメーターのどの所見と相関しているかを統計的に解析し、治療指針の一助となる可能性や、IVIg 治療の効果判定への有効性を検討しているが、H19年度の検討では、BioPlex 法で、多数を同時に検索したサイトカインのうち、stem cell factor などが一部が病理所見と相関し、これらの病理パラメーターおよびサイトカイン同時測定の実用性が示唆された。H20年度では、これらの現象の本疾患特異性と、さらなる臨床データとの相関性の追求を試みた。これらの病理所見は、EUVAS のスコアリングとの比較において、選択されているため、共通のパラメーターで今後議論が成立することが期待されるが、本疾患特異的なサイトカインストームの解析と、病理所見との相関性は、IVIg 治療の臨床経過追跡に有用なパラメーターの候補を提供する可能性を示した。

### A.研究目的

MPO-ANCA 陽性の MPA では、急性期には血中に炎症性サイトカイン、ケモカインのストームが起こるが、この時期に発症する急速進行性糸球体腎炎は特異的な半月体形成をとまなう、病理所見を呈する。これらの病理所見パラメーターの疾患活動性の指標としての有用性に関しては、H19年度より、圧倒的に MPA の頻度が高いわが国から特異的なパラメーター

の発信を行い、生検時の臨床所見パラメーターおよび、同時に多数の測定が可能な BioPlex によるサイトカインレベルとも比較して、病理マーカーと特異的に関連のあるサイトカインを同定して提唱してきた。H20年度はこのサイトカインストームが、本疾患特異的であるかどうか、さらに、昨年から引き続いて、疾患特異的な臨床検査所見や、さらなる病理所見との相関性を追求した。

## B. 方法

### 1) サイトカインの測定と対象症例

症例の治療前の血清でサイトカイン・ケモカインレベルを腎生検と同時に Bioplex で測定した。測定項目は 27plex array (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF) については正常人 58 例、I g A 腎症 26 例、MPA 23 例を対象として測定した。23plex cytokines (IFN- $\alpha$ 2, IL-1 $\alpha$ , IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, TNF- $\beta$ , M-CSF, MCP-3, MIF, MIG, b-NGF, TRAIL, HGF, CTACK, GRO- $\alpha$ , LIF, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1) については MPA 症例のみ測定した。

### 2) 病理パラメーターの選択

糸球体、尿細管・間質、血管のそれぞれの病変を活動性、および慢性進行性病変に分けて検討し、本疾患に特異的と考えられる病理パラメーターを選択した。これらの所見は Shigematsu らの提唱した、パラメーター群(参考文献1)、さらに欧州血管炎協会 (EUVAS) で提唱されている所見群(参考文献2)と比較して、整合性のある所見を選択した。これらを糸球体一個毎に検討して、尿細管病変、血管病変もスコア化して表示したこれらの詳細については、本年度論文化され報告した (Joh K, Muso E et al)。更に、72 症例 (男性 40 名、女性 32 名、平均 65.4 歳) を対象として、これらの所見を検討し、生検時の臨床パラメーターとしての、蛋白尿、血尿、腎機能、ANCA 値、貧血度、血圧、尿 NAG、尿 B2

MG と相関性を検討した。また、上記サイトカイン測定値と、その病理所見との相関を 21 症例の MPA で検討した。

## C. 結果

1、表に示すごとく、I g A 腎症では正常人に比して IL6, IL15, IL17, PDGF が上昇していたが、MPA ではおびただしい数のサイトカイン、ケモカインが正常人や I g A 腎症者に比して上昇しており、サイトカインストームの実態を示した。(表1)

2. サイトカイン・ケモカインと、各種臨床パラメーターとの関係性について

1) 血尿、タンパク尿 : IL15, IL18, MCP-1, MCSF が血尿の程度と正の相関を示した。蛋白尿については、さらに IL12p40 の程度が正の相関を示した。さらに腎機能については、IL8 が正の相関を示した。(図1, 2, 3)

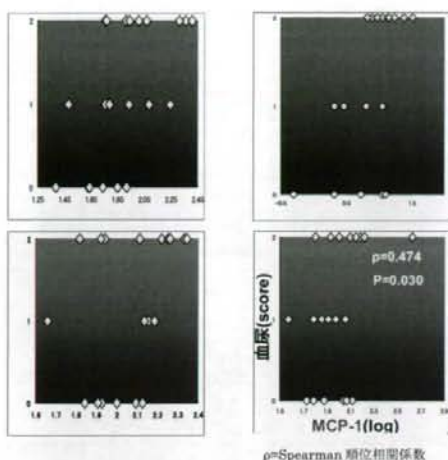
2) 病理パラメーターとの比較

IL12p40 は病変のある糸球体および血管病変と連動していることが確認された (図

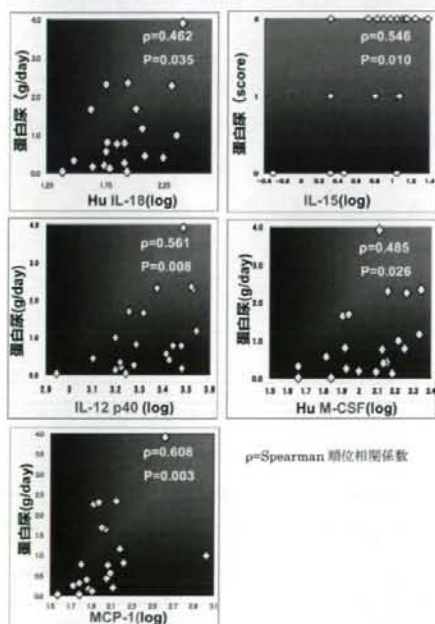
(表1) 正常人、IgA 腎症、MPA(治療前)の血中サイトカイン・ケモカイン (27-bioplex)

	Healthy subjects	IgA腎症	p	MPA	p
n	58	26		23	
IL-1 $\beta$	0.077	0.069	1	0.283	0.19
IL-1ra	0.24	1.97	0.1	2.022	0.012
IL-2	0.279	0.197	1	0.002	0.049
IL-4	-0.064	-0.057	0.94	0.079	0.81
IL-5	0.118	0.222	1	1.024	<0.0001
IL-6	-0.008	-0.191	1	0.21	0.0009
IL-7	-0.279	-0.221	0.8	0.1002	0.0009
IL-8	1.209	0.94	0.0049	1.224	0.0163
IL-9	1.06	1.09	0.7	2.266	<0.0001
IL-10	0.023	0.229	0.8	1.071	0.0002
IL-12p70	0.099	0.023	0.8	1.041	<0.0001
IL-13	0.173	0.163	1	0.066	0.113
IL-15	0.004	0.005	0.999	0.040	0.8
IL-17	0.046	0.049	0.999	0.061	<0.0001
Eotaxin	1.791	1.067	0.4	1.71	1
FGFbasic	1.09	1.09	0.99	1.011	0.09
G-CSF	0.076	0.069	0.89	0.019	0.68
GM-CSF	0.069	0.069	1	1.406	0.0021
IP-10	1.106	1.01	0.027	1.027	<0.0001
MCP-1	2.015	2.007	0.98	2.07	<0.0001
MIP-1 $\alpha$	1.018	1.72	0.06	1.008	0.109
MIP-1b	0.183	0.182	1	0.479	0.0017
MIP-1 $\gamma$	2.01	1.93	0.62	2.167	0.0014
PDGF	2.047	2.01	<0.0001	2.018	<0.0001
RANTES	0.061	0.069	1	0.194	0.179
VEGF	1.07	1.01	0.079	0.04	<0.0001



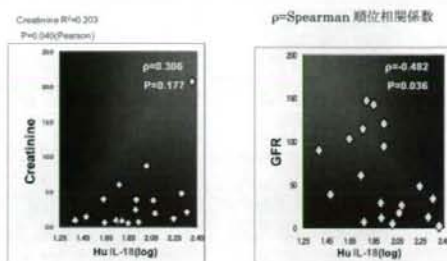


(図1) 血尿の程度と正相関を示すサイトカインとケモカイン

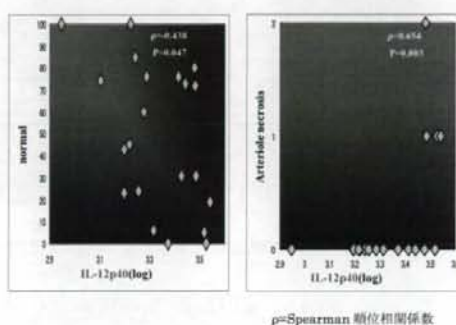


(図2) 蛋白尿と相関を示す各種サイトカイン・ケモカイン

4) が、個別のサイトカインアッセイで認められた、活動性、半月体形成病変との相関性は再現性がなかった。Stem cell factor(SCF)については従来より、硬化性病変との相関を見ていたが、MCSFも、糸



(図3) 腎機能はIL18とは負の相関を示す

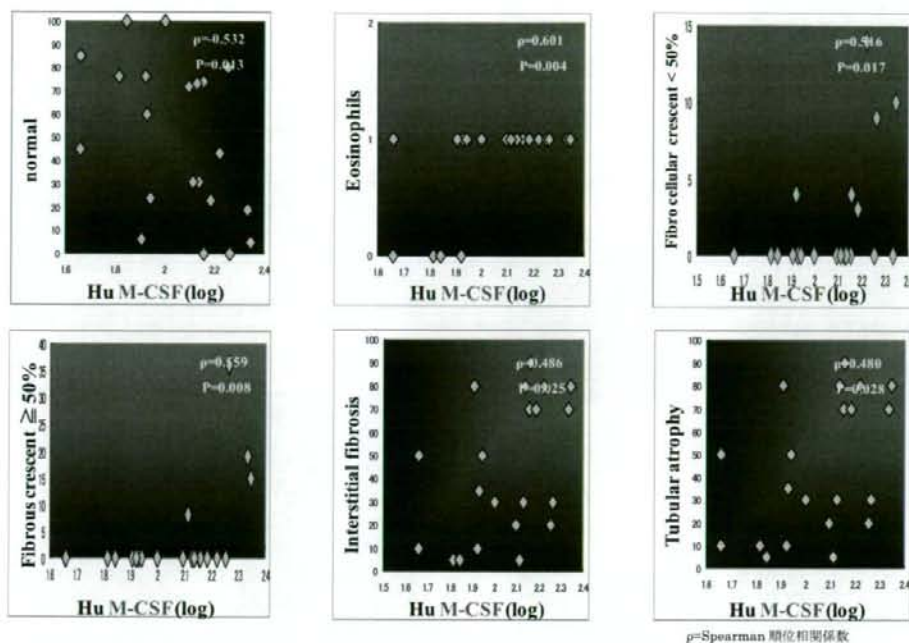


(図4) IL12p40 は病変のある糸球体および血管病変と連動する

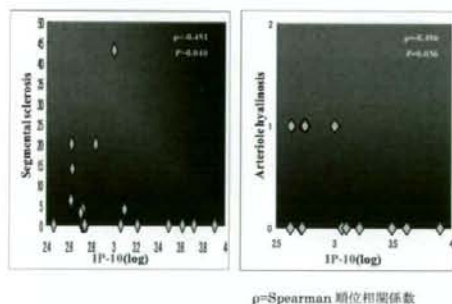
球体線維性半月体形成、間質線維化などと正相関を示した(図5)。また、血中 interferon inducible protein (IP-10)(CXCL10)は硬化所見と負の相関を示し(図6)、ケモカインとしての特殊性を暗示した。

#### D. 考察

我が国に多い、MPO-ANCA 関連腎炎血管炎のサイトカインストームともいえる、多数の炎症性サイトカインの上昇が、他の代表的慢性腎炎であるIgA腎症と比較しても、際立ったほぼすべてのサイトカインの上昇をきたしていることが再確認された。また、一方血尿、タンパク尿などの腎活動性病変と連動して動くサイトカインは比較的限られていることが示され、従来から確認していた病理パラメーターとの関連解析



(図5) M-CSF と各種病理パラメーターの相関血管病変と連動する



(図6) 血中 interferon inducible protein (IP-10)(CXCL10)は硬化所見と負の相関を示す

では、I L 12 p 40 の細胞性半月体形成とは今回は関連性が再現されなかった。このアッセイ系の更なる再現性への検討が必要である。活動性病変に加えて、間質線維化や糸球体の硬化性病変パラメーターと連動して動くサイトカインが確認され、急性期からすでに修復に向かうサイトカインの動きがあることが、推測された。これらから、

病変終息のために、これらのサイトカインを効果的に誘導することの可能性も示唆された。

#### 参考文献

- 1) ( Shigematsu H, Yamaguchi N, Koyama A. Glomerulointerstitial events in rapidly progressive nephritic syndrome, with special reference to histologic grade and stage on the renal lesions. Clin Exp Nephrol 1998;2:330-338)
- 2) (7. Bajema IM, Hagen EC, Hansen BE, Hermans J, Noel LH, Waldherr R, et al. The renal histopathology in systemic vasculitis: an international survey study of inter- and intra-observer agreement. Nephrol Dial Transplant. 1996 ;11:1989-95)

## E. 結論

我が国で多いMPO-ANCA陽性RPGNを来す、MPAでは、急性期のサイトカインストームは特異的で多方面におよぶが、検尿異常などの腎急性病変には、比較的限られたものが関与しており、病理パラメーターのうちでも硬化性病変との関連性の高いものが同定され、今後IVIg治療の病変終息の予見に使える可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## H. 研究発表

論文発表

1. Ito-Ihara T, Muso E, Kobayashi S, Uno K, Tamura N, Yamanishi Y, Fukatsu A, Watts R.A, Scott D, Jayne D, Suzuki K, Hashimoto H: Comparison of diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for antineutrophil cytoplasmic autoantibodies available in Japan and Europe. *Clinical Exp Rheumatol* ;26(6):1027-33, 2008
2. Watts RA, Scott DG, Jayne DR, Ito-Ihara T, Muso E, Fujimoto S, Harabuchi Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H. : Renal vasculitis in Japan and the UK—are there differences in epidemiology and clinical phenotype? *Nephrol Dial Transplant* ;23(12):3928-31.2008
3. Joh K, Muso E, Shigematsu H, Nose M, Nagata M, Arimura Y, Yumura W, Wada T, Nitta K, Makino H, Taguma Y, Kaneoka H, Suzuki Y, Kobayashi M, Koyama A, Usui J, Ozaki S, Tomino Y, Hashimoto H, Yamagata: Pathology of ANCA-related vasculitis: Proposal for standardization of pathological diagnosis in Japan *Clin Exp Nephrol* 12 277-291 2008

## [和文論文]

1. 古宮俊幸、辻井知美、石床 学、田原佐知子、米本智美、塚本達雄、武曾恵理:血液透析導入時にヘパリン起因性血小板減少症をきたした関節リウマチの2症例 透析会誌 41(9)627-633 2008
  2. 武曾恵理 :ガンマブログリン大量療法の血管炎に対する効果 特集 血管炎の診療に役立つ新たな知見 リウマチ科 40 (1) 44-52 2008
- ## 2. 学会発表
1. 武曾恵理:難知性血管炎・ネフローゼ症候群の治療の動向 第13回岡山ネフローゼ研究会 2009.1.28(岡山)
  2. 猪原登志子、武曾恵理、小林茂人、宇野賀津子、田村直人、山西裕司、深津敦司、Richard Watts、David Scott、David Jayne、鈴木和男、橋本博史:日本・欧州

- におけるANCA測定法の違いに関する検討 第14回MPO研究会 2008.10.24(東京)
3. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、八木克己、藤田哲也、鈴木和男：MPO-ANCA腎炎、IgA腎症患者、健康人の血漿中、サイトカイン・ケモカインとIFN- $\alpha$ 産生能の比較 第14回MPO研究会 2008.10.24(東京)
  4. 武曾恵理、伊藤彰彦、奥崎大介、小林茂人、岩崎由加子、古宮俊幸、橋本博史、鈴木和男、野島博：MPO-ANCA陽性顕微鏡的多発血管炎(MPA)の血液細胞でのM-ficolin転写誘導と腎での陽性細胞の局在 第14回MPO研究会 2008.10.24(東京)
  5. 立石悠、糟野健司、佐藤有紀、近藤尚哉、米倉由利子、飛野杏子、古宮俊幸、福内史子、米本智美、塚本達雄、武曾恵理：C型肝硬変に合併しステロイドが奏功したANCA陰性急速進行性糸球体腎炎の一症例 第22回京都腎臓セミナー 2008.9.20(京都)
  6. 武曾恵理、宇野賀津子、城謙輔、岩崎由加子、塚本達雄、古宮俊幸、糟野健司、鈴木和男：顕微鏡的多発血管炎の腎病理所見と各種サイトカインの連動性の検討 第51回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30(福岡)
  7. 小野孝彦、下沢真木子、泊裕輝、大塚秀隆、劉寧、北村久代、上村和秀、野垣文昭、森典子、武曾恵理、吉田治義：HIGAMマウスはToll-like receptor 4を発現し、LPS投与により凝固系活性化を介して腎炎を増悪する 第51回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30(福岡)
  8. 城謙輔、小池健太郎、中里毅、杉山隆夫、武曾恵理、湯村和子：MPO-ANCA関連血管炎の腎病変パラメーターと臨床情報との関連 第51回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30(福岡)
  9. 武曾恵理、城謙輔、湯村和子、杉山隆雄、小池健太郎、中里毅：MPO-ANCA関連血管炎の腎病理所見パラメーターの有用性の検討 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 進行性腎障害に関する調査研究 平成19年度研究業績発表会 2008.1.27(東京)